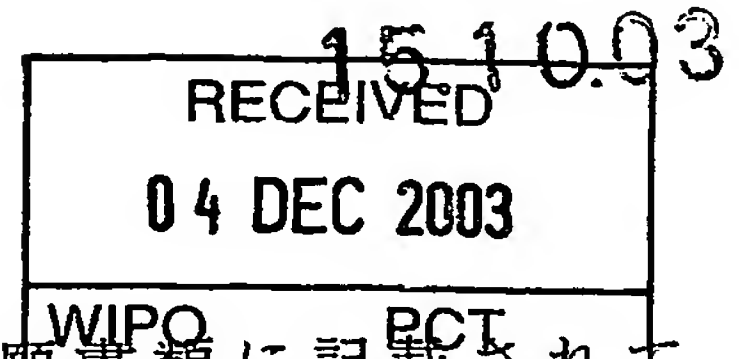


10/525877
PCT/JP03/10766

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 8月26日

出願番号
Application Number: 特願2002-245987
[ST. 10/C]: [JP 2002-245987]

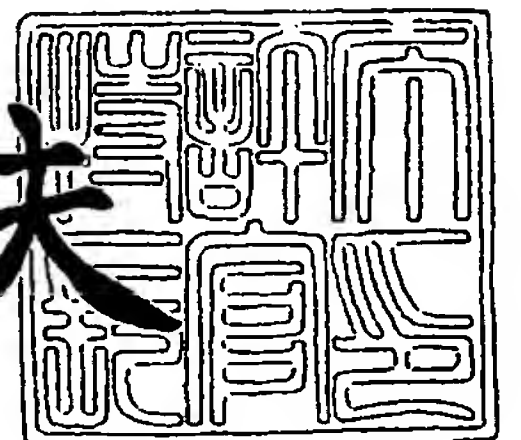
出願人
Applicant(s): 独立行政法人物質・材料研究機構

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3095820

【書類名】 特許願

【整理番号】 02-MS-30

【提出日】 平成14年 8月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 1/00

【発明の名称】 細胞培養方法とその装置

【請求項の数】 13

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市千現一丁目2番1号
独立行政法人物質・材料研究機構内

【氏名】 田中 順三

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市千現一丁目2番1号
独立行政法人物質・材料研究機構内

【氏名】 生駒 俊之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都日野市日野937-22

【氏名】 宗田 大

【特許出願人】

【識別番号】 301023238

【氏名又は名称】 独立行政法人物質・材料研究機構

【代表者】 岸 輝雄

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞培養方法とその装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞を培養する環境下で継続的に、遠心力による静水圧の付加で力学環境を調節し、細胞に刺激を与えることを特徴とする細胞培養方法。

【請求項 2】 静水圧の付加による力学的培養環境の調節では、遠心力によって細胞に対する静水圧の付加を周期的に変化させるか、もしくは一定期間持続することを特徴とする請求項 1 記載の細胞培養方法。

【請求項 3】 静水圧の付加が 6 0 M P a 以下の範囲で行なわれることを特徴とする請求項 1 または 2 の細胞培養方法。

【請求項 4】 静水圧の付加が 0 . 5 秒～6 週間の範囲で行なわれることを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれかの細胞培養方法。

【請求項 5】 静水圧の付加が遠心機の回転数の調節により行なわれることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかの細胞培養方法。

【請求項 6】 温度と雰囲気調節することを特徴とする請求項 1 ないし 5 のいずれかの細胞培養方法。

【請求項 7】 各種生体材料とともに細胞を培養することを特徴とする請求項 1 ないし 6 のいずれかの細胞培養方法。

【請求項 8】 密閉容器内に回転軸で支持されて遠心回転によって細胞に静水圧が付加される細胞培養器を備えていることを特徴とする細胞培養装置。

【請求項 9】 細胞培養器の回転時間と回転速度を制御する制御機構が備えられていることを特徴とする請求項 8 の細胞培養装置。

【請求項 1 0】 6 0 M P a 以下の静水圧を付加するために回転数が 1 0 ～2 5 0 0 0 r p m の範囲で制御可能とされていることを特徴とする請求項 8 または 9 の細胞培養装置。

【請求項 1 1】 細胞培養器内部が同時に複数種類の細胞培養ができるように区分されていることを特徴とする請求項 8 ないし 1 0 のいずれかの細胞培養装置。

【請求項 1 2】 密閉容器内への雰囲気ガスの注入口とその排気口、並びに雰

囲気ガスの注入・排気の制御機構が備えられていることを特徴とする請求項 8 ないし 1 1 のいずれかの細胞培養装置。

【請求項 1 3】 密閉容器内の温度の制御機構が備えられていることを特徴とする請求項 8 ないし 1 2 のいずれかの細胞培養装置。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は細胞の培養方法とその装置に関するものである。さらに詳しくは、再生医学に有用な特定の細胞等を簡便に効率的に得ることができる新しい細胞培養方法とその装置に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術と発明の課題】

従来より、細胞の培養においては、培地の表面層にだけ伸展する単層細胞培養では所定の細胞が途中脱分化し機能を失ってしまうため、これを防ぐために成長因子・薬剤などを添加して脱分化を制御する方法や、機械的刺激により細胞機能を活性化する方法がとられている。

【0 0 0 3】

このうちの機械的刺激によって細胞脱分化を制御する方法としては静水圧を用いる方法 (Effects of physical stimulation on chondrogenesis in vitro, Materials Science and Engineering C 6 (1998) 301-306) と遠心力を利用する高密度培養技術が知られている。

【0 0 0 4】

しかしながら、従来の静水圧を利用する方法は、コストが高いだけでなく培養装置が大型で広いスペースを必要とするという欠点があり、一方、従来の遠心力の利用による方法は、あらかじめインキュベーターでの培養の後に、常温で遠心力を加えることから、培養環境としては継続的に長時間刺激を加えることや、周期的に刺激を変化させることはできないという問題があった。しかも従来の遠心力の利用法では、温度や雰囲気を制御することもできなかった。

【0005】

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの従来の問題点を解消し、機械的刺激によって脱分化を抑制して簡便に効率的な細胞培養を可能とする新しい方法とそのための装置を提供することを課題としている。

【0006】

【課題を解決するための手段】

この出願の発明は、上記の課題を解決するためのものとして、第1には、細胞を培養する環境下で継続的に、遠心力による静水圧の付加で力学環境を調節し、細胞に刺激を与えることを特徴とする細胞培養方法を提供する。また、第2には、静水圧の付加による力学的培養環境の調節では、遠心力によって細胞に対する静水圧の付加を周期的に変化させるか、もしくは一定期間持続することを特徴とする上記細胞培養方法を提供し、第3には、静水圧の付加が60 MPa以下の範囲で行われることを特徴とする上記細胞培養方法を、第4には、静水圧の付加が0.5秒～6週間の範囲で行われることを特徴とする上記細胞培養方法を、第5には、静水圧の付加が遠心機の回転数の調節により行なわれることを特徴とする上記細胞培養方法を、第6には、温度と雰囲気気を調節することを特徴とする上記細胞培養方法を提供する。そして、この出願の発明は、第7には、各種生体材料とともに細胞を培養することを特徴とする上記細胞培養方法を提供する。

【0007】

さらにこの出願の発明は、第8には、密閉容器内に回転軸で支持されて遠心回転によって細胞に静水圧が付加される細胞培養器を備えていることを特徴とする細胞培養装置を提供し、第9には、細胞培養器の回転時間と回転速度を制御する制御機構を備えていることを特徴とする上記細胞培養装置を、第10には、60 MPa以下の静水圧を付加するために回転数が10～25000 rpmの範囲で制御可能とされていることを特徴とする上記細胞培養装置を、第11には、細胞培養器内部が同時に複数種類の細胞培養ができるように区分されていることを特徴とする上記細胞培養装置を提供する。

【0008】

第12には、この出願の発明は、密閉容器内への雰囲気ガスの注入口とその排

気口、並びに雰囲気ガスの注入、排気の制御機構が備えられていることを特徴とする上記の細胞培養装置を提供し、第 1 3 には、密閉容器内の温度の制御機構が備えられていることを特徴とする上記細胞培養装置を提供する。

【 0 0 0 9 】

生物の成長には未分化で機能が特定されていない幹細胞が分化を繰り返しながら順次その機能が特定されて、種々の器官や組織になっていくのであるが、この生物の体内で行なわれている細胞分化は常に同じ条件下で行なわれているわけではなく生体内での圧力や温度等の環境は変化している。

【 0 0 1 0 】

この出願の発明は、この点に着眼したものであり、細胞培養を実際の生体内の環境に近い条件下で行なおうとするものである。この生体内に類似した環境を創出しようとするこの出願の発明では、前記のとおり、細胞の培養を、遠心力による静水圧の付加で培養環境を調節して行なうことを特徴としている。

【 0 0 1 1 】

このような特徴は、遠心力によって回転駆動される試料管内部の液体には絶えず遠心力と静水圧がかかっており、しかも、遠心力と静水圧の大きさは遠心機の回転数を調整することにより簡単に制御することができること、そしてこのことを細胞の培養時に実現することで、細胞に刺激を与えて活性化し、細胞脱分化を抑制することができるとの知見に基づいている。

【 0 0 1 2 】

そして、この出願の発明は、培養の温度、雰囲気の制御も実現する。この出願の発明では、このようにして細胞の活性化・脱分化を制御しながら増殖をするとともに、細胞間に張り巡らされて細胞の生存を維持し、増殖・分化を制御する様々な情報が書き込まれているとされる細胞外マトリックスを含む各種生体材料も短時間に入手することを可能とする。再生医学への応用が有望である。

【 0 0 1 3 】

たとえば、この発明の細胞培養装置を回転させて細胞に 0 . 1 M P a ~ 3 0 M P a の静水圧を周期的に与えることによって人間の歩行のリズムと同等の生体内環境を創出することができるばかりでなく、高い重力（たとえば深海での環境）

も制御できものであり、そして周期的に変化する静水圧と遠心力を細胞に作用させることによって細胞の活性を高めて、遠心力により細胞凝集体が形成され、また静水圧により細胞の代謝を調節して脱分化を制御することができるものである。

【0 0 1 4】

以上のような特徴は、従来の静水圧の利用法や、あらかじめ培養を行なった後に遠心力を作用させ従来の方法からは全く想定することができず、実現もされなかったものである。

【0 0 1 5】

【発明の実施の形態】

この出願の発明は上記のとおりの特徴を有するものであるが、以下にその実施の形態について説明する。

【0 0 1 6】

まず、この出願の発明の細胞培養方法とその装置の概要を図に従って説明すると、図 1 は細胞培養装置の全体図を示したものであり、蓋 (2) の開閉によって細胞および培養液の充填と取り出しが自由にできるようになっている。この細胞培養器 (1) は加熱機構 (5) を備えた密閉容器 (6) 内でモータ (3) に連結した回転軸 (4) に支持されている。また、この密閉容器 (6) は炭酸ガスを混入された水蒸気 (G) が循環されている。この雰囲気ガスは、蓋 (2) の開閉によって、あるいは蓋 (2) に設けた通路を介して細胞培養器 (1) 内に注入、もしくはそこから排気されるようにしている。そして、細胞培養器 (1) の回転速度や回転時間、温度および雰囲気ガスの条件は、あらかじめ設定された制御機構 (C) によって制御されている。

【0 0 1 7】

図 2 は、図 1 の細胞培養器 (1) の内部を部分的に例示した模式図であり、回転軸 (3) に連結された試験管状の容器 (7) を細胞と培養液を入れて回転することによって容器 (7) 内の細胞に遠心力 (9) による静水圧を与えることができるようにしている。

【0 0 1 8】

この時の回転速度や回転時間は図1の制御機構（C）で制御される。これによって細胞にかかる静水圧と遠心力の大きさと時間は任意に制御可能とされる。

【0019】

静水圧の大きさと遠心力については、たとえば次のように表される。

【0020】

【表1】

Hydrostatic pressure

溶液の高さに依存

Centrifugal Force

（細胞・材料に掛かる。）

$$HP(\text{atmcm}^2/\text{Kg})=5.48 \times 10^{-9} \times D \times Q^2 (r^2 - r_{\text{mem}}^2)$$

$$RCF(G)=11.18 \times r(\text{cm}) \times (Q/1000)^2$$

D：溶液の平均密度（g ml⁻¹）

r：粒子と中心の距離

r：中心からの距離（cm）

Q：回転速度（rpm）

r_{mem}：液体表面からの回転中心までの距離（cm）

【0021】

これによって、回転数と静水圧との関係を例示すると次のようになる。

【0022】

【表2】

細胞培養溶液（MEM）： 1.14g/cm⁻¹

溶液の高さ： 2cm

回転数： 3000rpm 5000rpm 10,000rpm

静水圧： 2MPa 5.6Mpa 22.5Mpa

【0023】

図3は回転速度を一定時間保持した時の容器（7）の静水圧を示したものであり、また、図4は回転速度を間歇的に変化させた時の容器（7）内の静水圧の変化を図示したものである。この出願の発明は、たとえば、このような図3および図4に単純化して例示されている容器内の静水圧の付加パターンやそれら付加パターンを組み合わせながら行なうものであるが、組合せを行なうための条件設定としては下記の認識に基づいている。

【0 0 2 4】

すなわち、生体内環境に類似する培養環境下で細胞を培養させる場合の静水圧を形成するための具体的な回転数としては1 0 ~ 2 5 0 0 0 r p mが好ましく、特に1 0 ~ 2 3 0 0 0 r p mが好ましいとしているが、これは、回転数が2 5 0 0 0 r p mを超えると静水圧が6 0 M P aを超えて細胞が破壊されてしまう可能性があるためである。

【0 0 2 5】

また、静水圧の付加時間として0. 5 秒~ 6 週間の範囲に特定しているのは、人間が激しい運動をした時に受ける時の圧のサイクルは0. 5 秒と言われている。また一方、人間の身体に移植する際に使用されている細胞の培養期間は大体4 週間以内であることに基づくものである。

【0 0 2 6】

さらに、温度条件としては現存する生体体温の範囲である0℃~ 5 0℃程度が好ましいが、一般的な生体の体温範囲である2 5℃~ 4 0℃程度が特に好ましい。

【0 0 2 7】

このような条件下で細胞培養したものと従来の方法で細胞培養したものを比較したのが図5である。この図5はこの出願の発明で培養したもの（黒丸で表示）と従来の高密度培養（白四角で表示）および単層培養（白丸で表示）したものを1 週間~ 3 週間培養した時の細胞数をプロットしたものである。図5から明らかなように3 週間後にはこの出願の発明のものは従来の高密度培養に比較して1 5 %、また従来の単層培養に比較して3 0 %の細胞増殖率となっている。

【0 0 2 8】

以下にこの出願の発明と単層培養の実施例を示してさらに詳しく説明する。

【0 0 2 9】

もちろん、以下の例によって発明が限定されることはない。

【0 0 3 0】

【実施例】

軟骨細胞（ 5×10^4 個／m l）をMEM（M i n i m u m E s s e n t i

a l Medium) 培養液により、25℃の温度、大気中の雰囲気中で1週間、遠心培養した。遠心条件は、1日に2回、1000rpmで30分間回転させる操作を1週間に3回行なった。一方、コントロールとして単層培養を行なった。

【0031】

遠心培養を行なった結果、最終的な細胞数は 10.2×10^4 個/mlであったのに対し、単層培養では 8.4×10^4 個/mlであり、単層培養に比較して、遠心培養の方が少なくとも20%増殖率が向上することを示している。

【0032】

また、この時の状態を位相差顕微鏡写真で対比したのが図6および図7である。

【0033】

この出願の発明の遠心培養法（図6）によって増殖した細胞の数は単層培養法（図7）によって増殖した細胞の数に比較して明らかに増加している状態が示されている。さらに、遠心培養により軟骨細胞に特有な球形状が維持されたが、単層培養では脱分化して繊維化が進んだ細胞に変化した。

【0034】

以上の結果から、遠心培養により、細胞の増殖率が高くなると同時に細胞の脱分化が抑えられることが確認された。

【0035】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって細胞を活性化し、脱分化を抑制して、再生医学における細胞増殖の足場材を効率的に作製できるだけでなく、テーラーメイド医療と称される患者の個人差を重視した特定細胞の増殖等を簡便、かつ、効率的に行なうことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

この出願の発明の細胞培養装置の概要を例示した断面構成図である。

【図2】

細胞培養器内の試験容器と付加される力について例示した模式図である。

【図 3】

同じ静水圧を保った状態を例示した静水圧と時間との相関図である。

【図 4】

周期的に静水圧を変化させた状態を例示した静水圧と時間との相関図である。

【図 5】

この出願の遠心力を利用する発明と従来法である高密度培養法および単層培養法の細胞数の増加を示すグラフである。

【図 6】

この出願の発明の静水圧を付加する方法で 1 週間培養した細胞の位相差顕微鏡写真である。

【図 7】

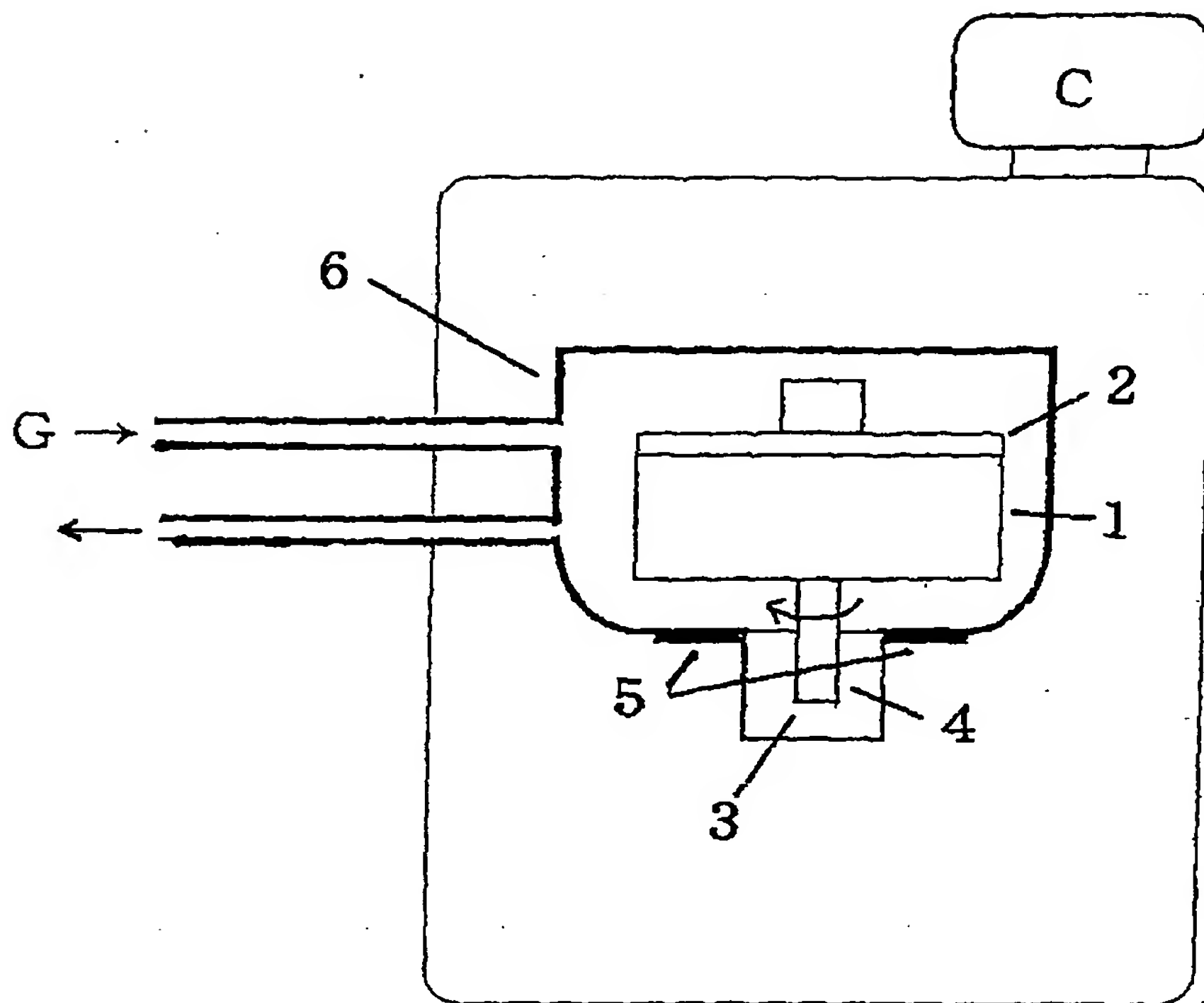
従来の単層培養法で 1 週間培養した細胞の位相差顕微鏡写真である。

【符号の説明】

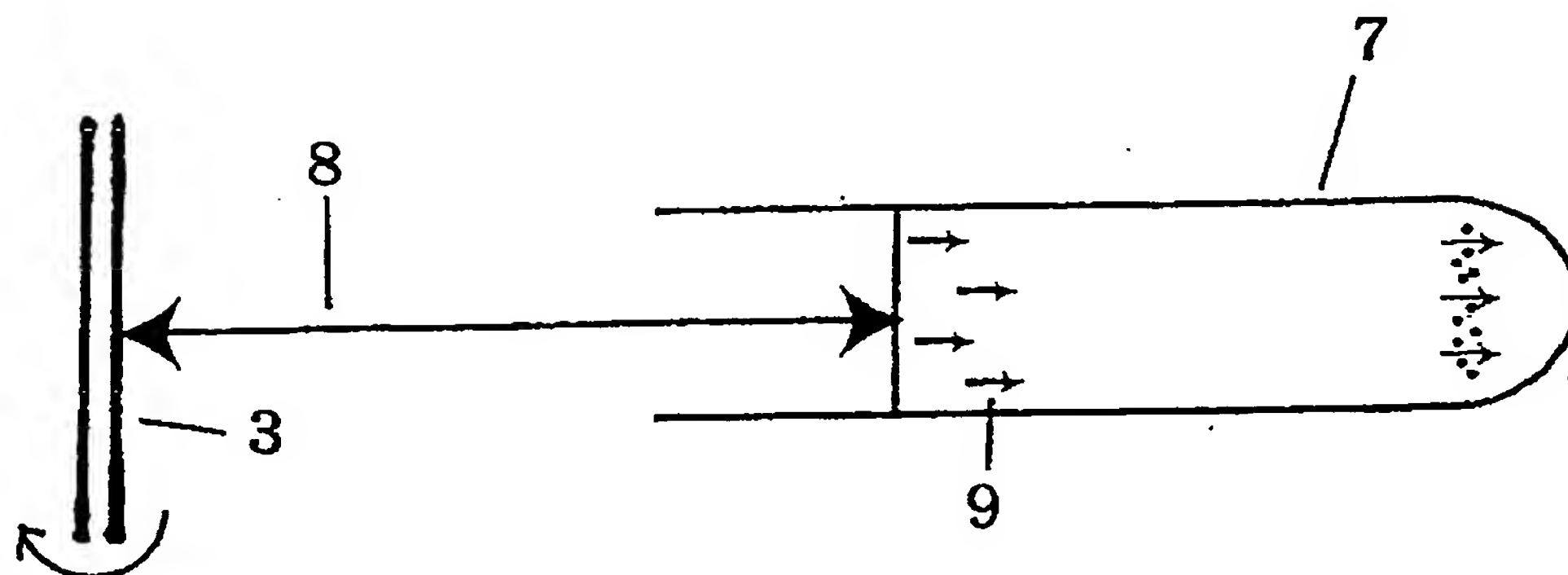
- 1 細胞培養器
- 2 細胞培養器の蓋
- 3 回転軸
- 4 モータ
- 5 加熱器
- 6 密閉容器
- 7 培養管
- 8 回転軸と培養液面間の距離
- 9 遠心力
- C 制御機構
- G 炭酸ガス混入水蒸気

【書類名】 図面

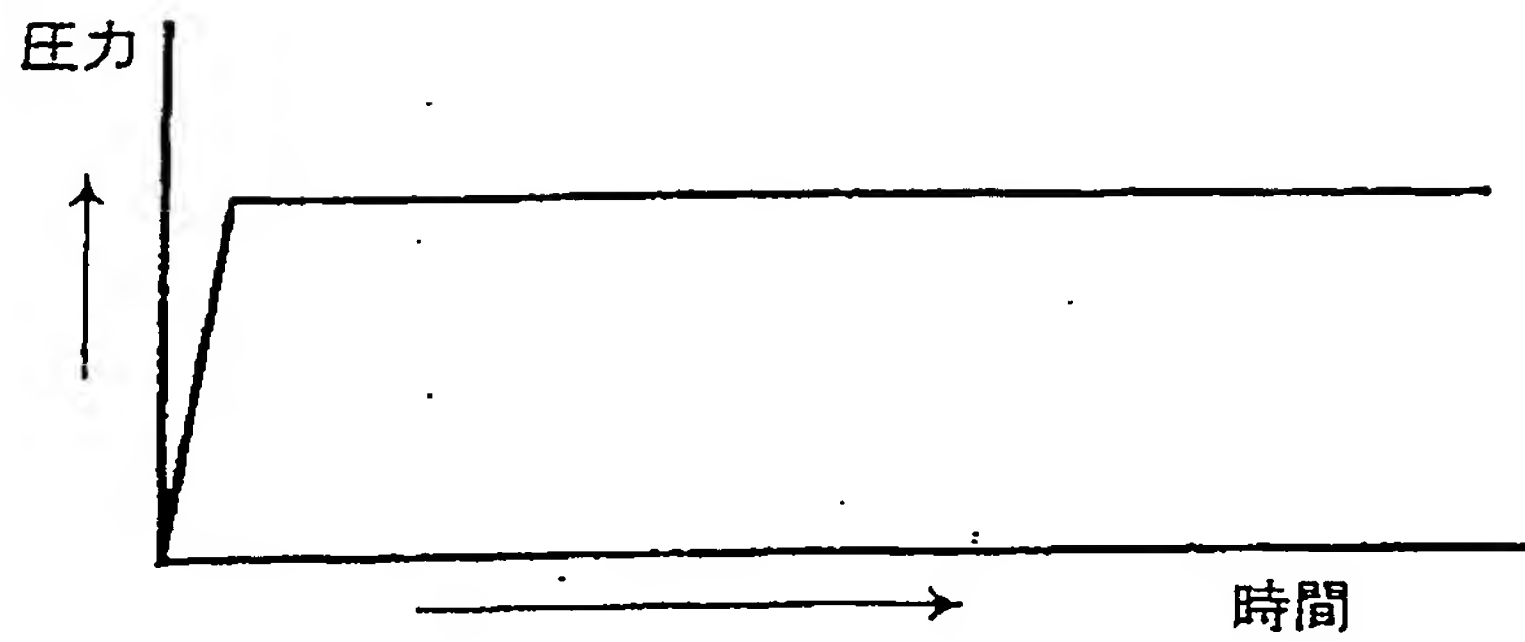
【図 1】



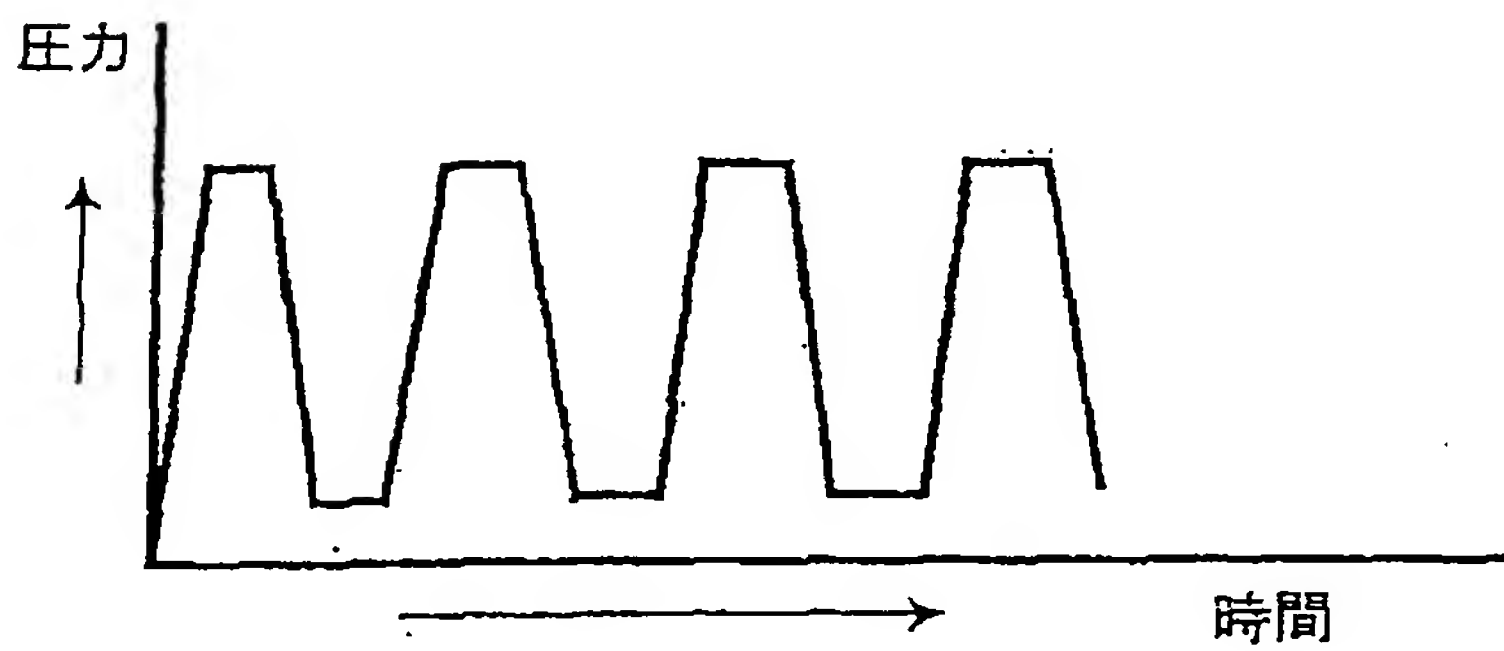
【図 2】



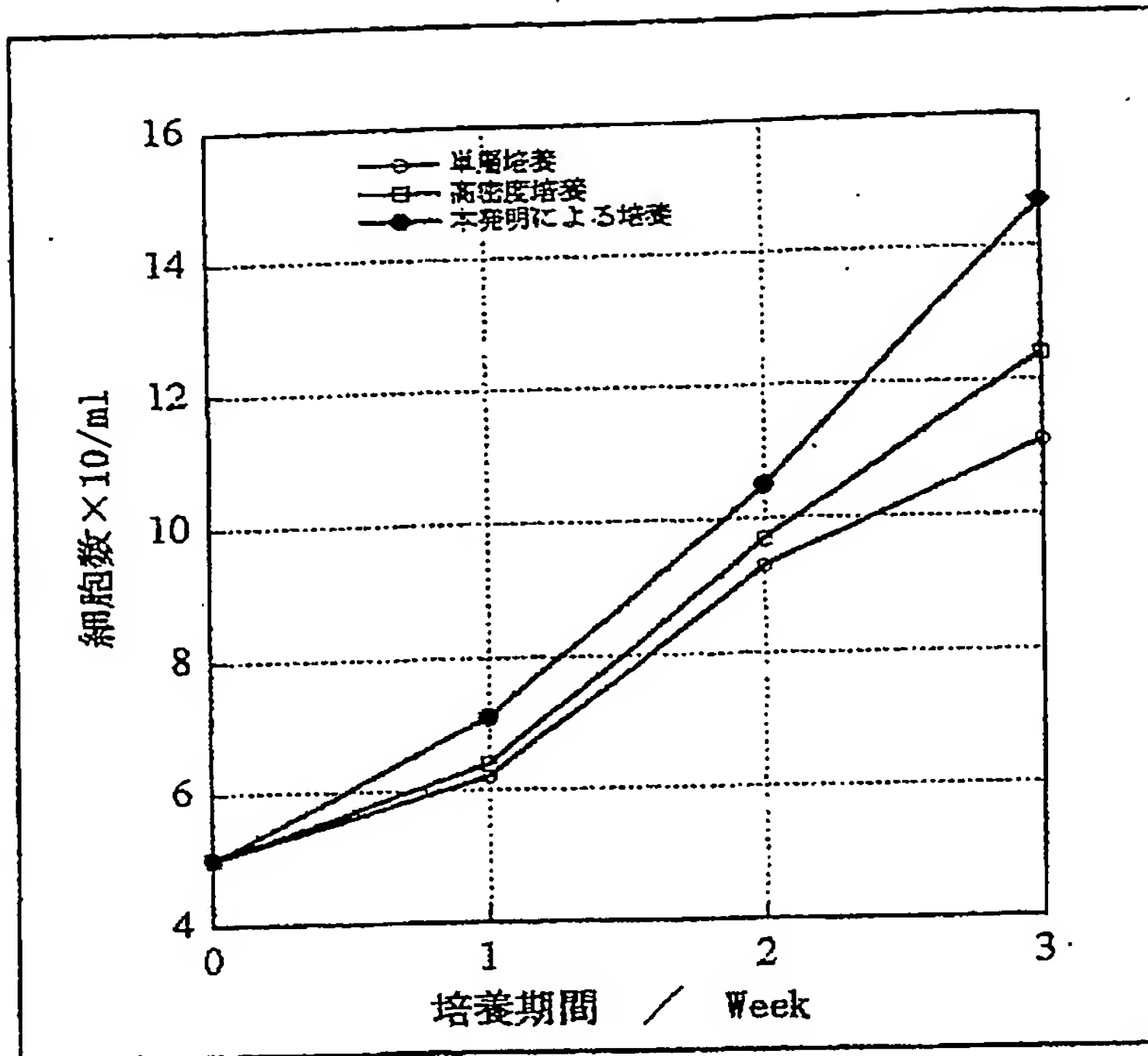
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞を培養するに際し、細胞を活性化し、脱分化を抑えて、効率的な培養を行なう。

【解決手段】 温度と雰囲気ガスが制御された条件下で細胞培養器を回転することによって遠心力による静水圧を付加して培養する。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 2 - 2 4 5 9 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 1 0 2 3 2 3 8]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市千現一丁目 2 番 1 号

氏 名

独立行政法人物質・材料研究機構